

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/DE04/002761

International filing date: 13 December 2004 (13.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE  
Number: 103 59 830.8  
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 16 March 2005 (16.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND****Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 59.830.8

**Anmeldetag:** 12. Dezember 2003

**Anmelder/Inhaber:** co.don AG, 14513 Teltow/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzell-  
transplantaten und dessen Anwendung als Trans-  
plantationsmaterial

**IPC:** C 12 N 5/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Januar 2005  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

  
Schäfer

**PATENTANWÄLTE**  
**GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG**

European Patent and Trademark Attorneys  
Patente Marken Design Lizenzen

GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.  
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.\*  
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.\*\*  
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.\*

Schützenstraße 15-17  
D-10117 Berlin

Tel.: 030/264 13 30

Fax: 030/264 18 38

e-mail: [PatentAttorneys.GHZ@t-online.de](mailto:PatentAttorneys.GHZ@t-online.de)

Internet: <http://www.berlin-patent.net>

Unser Zeich./our reference

**P248203DE**

Datum/date

**Berlin, 12. Dezember 2003**

co.don Aktiengesellschaft  
Warthestraße 21  
14513 Teltow

Erfinder: Dr. Meisel, Dr. Josimovic-Alasevic, Dr. Libera,

---

**Verfahren zur Herstellung von**  
**Bandscheibenzelltransplantaten und dessen Anwendung als**  
**Transplantationsmaterial.**

---

5

10

---

Verfahren zur Herstellung von  
Bandscheibenzelltransplantaten und dessen Anwendung als  
Transplantationsmaterial.

---

**Abstract**

Verfahren zur in vitro Herstellung von vitalen  
Bandscheibenknorpelzelltransplantaten,

20

dadurch gekennzeichnet, dass aus einem menschlichen  
(oder tierischen Organismus) vorgefallenem, degeneriertem  
Bandscheibengewebe Bandscheibenknorpelzellen gewonnen  
werden, diese dann in Zellkulturgefäßen so lange kultiviert  
werden bis eine ausreichende Menge an Bandscheibenzellen  
vorliegt, welche ihren nativen Phänotyp nicht verändert  
haben sowie ein hohes Proliferations- und  
Differenzierungspotential haben.

25

**Beschreibung**

30

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro  
Herstellung von

35

Bandscheibenknorpelzelltransplantaten aus  
vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe erkrankter  
Patienten und dessen Anwendung als Transplantationsmaterial  
zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben

5

und von

dreidimensionalem, vitalen, und mechanisch stabilen Bandscheibenknorpelgewebe und dessen Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben

10

sowie deren Verwendung zur Testung von Wirkstoffen. Gegenstand der Erfindung sind auch die hergestellten Bandscheibenzelltransplantate und die hergestellten Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die Zelltransplantate beinhalten.

20

Die Degeneration der Bandscheiben wird während der Alterung oder durch Trauma ausgelöst und induziert akute und chronische Schmerzen und Instabilitäten in der Wirbelsäule. Mehr als 300.000 Patienten in Europa leiden an Bandscheibenerkrankungen. Die wenigen herkömmlichen Behandlungsmöglichkeiten beinhalten die Entfernung von aus dem Inneren der Bandscheibe ausgetretenen Gewebes in den Spinalkanal bei gleichzeitig intakter äußerer Hülle oder die Entfernung der gesamten Bandscheibe gefolgt vom Einsatz eines Implantates oder aber auch gefolgt von einer Fusion der beiden angrenzenden Wirbelkörper. Jedoch führen all diese Methoden zur Immobilisierung bzw. Funktionsverlust des Segmentes und teilweise auch zur Beeinflussung der benachbarten Bandscheiben.

30

Hier ist erstmals ein Verfahren beschrieben, durch welches Bandscheibenzelltransplantate hergestellt werden können, welche nach Transplantation in eine geschädigte/ degenerierte Bandscheibe durch den Aufbau neuen Bandscheibengewebes die Erhaltung der Bandscheibe und damit

35

5 die Wiederherstellung ihrer neurologischen und mechanischen Funktion nach einem Bandscheibenvorfall, dem Austreten von Bandscheibengewebe aus der Bandscheibe heraus, als Folge der Degeneration der Bandscheibe erlaubt.

10 Weiterhin wird erstmalig ein Verfahren beschrieben, welches auch bei fortgeschrittener Degeneration der Bandscheibe, d.h. auch bei Degeneration oder traumatischer Schädigung der äußeren Schicht der Bandscheibe (Annulus Fibrosus) die Wiederherstellung und Erhaltung der neurologischen, biologischen und mechanischen Funktion der Bandscheibe ermöglicht,

wobei ersteres Verfahren auf die Herstellung eines Bandscheibenzelltransplantates und letzteres auf die Herstellung eines Bandscheibengewebetransplantates beides unter Verwendung von körpereigenen Zellen isoliert aus vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe abzielt.

Eine bekannte Methode unter Verwendung von körpereigenen Zellen ist die Knorpelzelltransplantation, die zur Behandlung von Gelenksknorpeldefekten angewandt wird. Dabei wird das Potential der Gelenksknorpelzellen genutzt, um in vivo neues Gewebe aufzubauen. So werden beispielsweise dem Patienten Gelenksknorpelbiopsien entnommen, daraus Knorpelzellen isoliert, mittels Zellkultivierung vermehrt und anschließend dem Patienten die Zellen im Bereich des Gewebedefektes, z.B. durch Einspritzen, transplantiert. 30 Dort bilden sie neues Gewebe und füllen somit den Defekt vollständig auf. Durch die genannten Verfahren wird bekanntermaßen erreicht, daß nach Applikation der Zelltransplantate im Körper Gewebe aufgebaut wird.

5 Für das Tissue Engineering auf dem Gebiet der  
Bandscheiberegeneration besteht das Ziel darin, nach  
degenerativer Schädigung der Bandscheibe ein  
Bandscheibenknorpelgewebe in der Bandscheibe mittels eines  
medizinisch und ethisch vertretbaren Verfahrens aufzubauen  
10 durch: Transplantation eines speziellen Zelltransplantates  
oder durch Transplantation eines außerhalb des Körpers  
vorgefertigten 3-dimensionalen Bandscheibenknorpelgewebe.  
In der Literatur gibt es dazu bisher keine Angaben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb,  
derartige Verfahren zur Herstellung von  
Bandscheibenknorpelzelltransplantaten und stabilem vitalen  
Bandscheibenknorpelgewebe bereitzustellen, die zur  
Transplantation und zum schnellen Wiederaufbau und der  
Erhaltung der Funktion der Bandscheibe geeignet sind. Dabei  
20 war essentiell, daß eine Methode gefunden wird, bei der das  
Ausgangsmaterial zur Herstellung der Zelltransplantate  
medizinisch und ethisch vertretbar entnommen werden kann  
sowie die sicherstellt, dass die kultivierten  
Bandscheibenzellen ihre Eigenschaften über den Zeitraum von  
der Entnahme bis zur Transplantation, die erst ca. 2 bis 3  
Monate nach der Biopsatentnahme erfolgt, nicht verändern  
sowie eine hohe Proliferations- und  
Differenzierungskapazität aufweisen.

Ausgangsmaterial ist erfindungsgemäß das degenerierte,  
30 vorgefallene Bandscheibengewebe, da aus ethischen aber auch  
medizinischen Gründen für eine Behandlung in der  
beschriebenen Weise keine andere Gewebequelle, wie eine  
intakte benachbarte Bandscheibe, für adulte  
Bandscheibenzellen zur Verfügung steht. Bisher wird  
35 angenommen, dass es nicht möglich ist aus degeneriertem

5 Gewebe, adulte Zellen in ausreichender Anzahl zu isolieren,  
die vital sind, ausreichend proliferieren und anschließend  
auch noch in der Lage sind gewebespezifisch zu  
differenzieren und Bandscheibengewebe aufzubauen, da in  
10 Geweben, die einer Degeneration unterliegen  
gewebespezifische Zellen absterben und auch durch andere  
Zellen mit anderen gewebe-unspezifischen Eigenschaften  
ersetzt werden. Überraschenderweise, konnte jedoch aus  
vorgefallenem degenerierten Bandscheibengewebe eine  
ausreichende Anzahl an vitalen Zellen isoliert werden, die  
unter den gegebenen Kulturbedingungen dann auch noch  
proliferieren und gewebespezifisch differenzieren und damit  
für eine zell-basierte Therapie zur Wiederherstellung der  
Funktion der Bandscheibe geeignet sind.

20 Wichtig bei der Behandlung mit den hergestellten  
Bandscheibenzelltransplantaten ist, daß vor der  
Transplantation die äußere Hülle der Bandscheibe, der  
Annulus Fibrosus, der durch den Austritt des  
Bandscheibengewebes geschädigt wurde, in der Art heilt, daß  
keine Flüssigkeit, wie die hergestellten Zelltransplantate,  
aus dem Inneren der Bandscheibe mehr auslaufen kann. Dieser  
Zeitraum kann patienten-abhängig bis zu 3 Monate andauern.  
Während dieses Zeitraumes werden die  
Bandscheibenzelltransplantate hergestellt, wobei die  
Bandscheibenzellen innerhalb dieser Zeit ihre gewebe-  
spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf deren  
30 Differenzierungspotential und damit den Erfolg der  
Transplantation nicht verändern dürfen.

Außerdem sollen die in vitro hergestellten Zell- und  
Gewebetransplantate keine immunologischen Reaktionen im  
35 Organismus, der das Transplantat erhält, auslösen.



5 Es wurde überraschender Weise gefunden, daß diese Aufgabe mit dem in Anspruch 1 angegebenen, einfachen Verfahren gelöst werden kann.

10 Erfindungsgemäß werden als Ausgangsmaterial patienteneigene vorgefallene, degenerierte Bandscheibengewebe verwendet. Aus den Biopsien werden die Bandscheibenzellen aus dem degenerierten, vorgefallenen Bandscheibengewebe mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch Auswandern oder durch Reagenzien, die Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese Zellen werden dann zunächst erfindungsgemäß nur unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen und ohne den Zusatz von Antibiotika und mit üblichem Kulturmedium in Zellkulturgefäßen kultiviert und so lange 20 vermehrt, bis eine ausreichende Menge an Zellen zur Verfügung steht. Dieser Zeit wird so kurz wie möglich gehalten und die Zellen so wenig wie möglich passagiert, um ihre phänotypischen Eigenschaften nicht zu verändern. Dies wurde überraschenderweise beobachtet, wenn die Zellen lange kultiviert werden und öfters passagiert werden. Nach ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese geerntet und das Zelltransplantat bestehend aus einer Bandscheibenzellsuspension hergestellt.

30 In einem zweiten Verfahren werden die isolierten Bandscheibenzellen vorkultiviert und ohne Passagierung der Zellen nur kurzzeitig vermehrt. Danach werden die vorkultivierten Zellen geerntet und eingefroren und bis zum Zeitpunkt der Transplantation tiefgefroren gelagert. Vor der Transplantation werden die Zellen aufgetaut und bis zum 35 Erreichen einer ausreichenden Zellzahl mit autologem Serum

5 und in herkömmlichem Zellkulturmedium weiterkultiviert.  
Nach ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese  
geerntet und das Zelltransplantat bestehend aus einer  
Bandscheibenzellsuspension hergestellt. Überraschenderweise  
wurde festgestellt, daß die Bandscheibenzellen durch das  
10 Einfrieren und Auftauen sowie anschließendes kurzzeitiges  
Vermehren nicht ihre spezifischen Eigenschaften im Hinblick  
auf die Synthese von Matrixproteinen verlieren. Dies wurde  
jedoch gefunden, wenn die Bandscheibenzellen über die 2-3  
Monate bis zur Transplantation in Monolayer ohne Einfrieren  
gehalten wurden.

In einem dritten Verfahren werden als Ausgangsmaterial  
ebenfalls patienteneigene vorgefallene, degenerierte  
Bandscheibengewebe verwendet. Aus den Biopsien werden die  
gewebeaufbauenden Zellen mittels enzymatischem Verdau des  
20 Gewebes, durch Auswandern oder durch Reagenzien, die  
Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese  
Zellen werden dann erfindungsgemäß mit üblichem  
Kulturmedium zunächst in Monolayer kultiviert bis eine  
ausreichende Zellzahl erreicht ist und anschließen in  
Zellkulturgefäße mit hydrophober Oberfläche und sich  
verjüngendem Boden überführt und dort so lange stationär in  
Suspension kultiviert, bis ein dreidimensionales Zell-  
aggregat entsteht, das zu mindestens 40 Volumen%, vorzugs-  
weise mindestens 60 Volumen% bis maximal 99 Volumen%,  
extrazelluläre Matrix (ECM) beinhaltet, in welche  
30 differenzierte Zellen eingebettet sind. Das entstandene  
Zellaggregat weist einen äußeren Bereich auf, in welchem  
proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind.  
Diesen Aufbau der erfindungsgemäß erhaltenen  
35 Bandscheibenknorpelgewebe verdeutlicht die mikroskopische

5 Aufnahme in Abb. 1, der Querschnitt eines erfindungsgemäß hergestellten Bandscheibengewebes mit M als Zone vermindelter Proliferation und Bildung von gewebespezifischen Matrixproteinen und P als äußere Proliferationszone zeigt.

10 Es ist erstaunlich, daß die aus den vorgefallenen, degenerierten Bandscheibengeweben isolierten Bandscheibenzellen eine hohe Proliferationskapazität (Abb. 2) sowie ein sehr hohes Differenzierungspotential zur Bildung bandscheibenspezifischer Matrixproteine und Markerproteine, die sind Aggrecan (Abb. 3a), hyalin-spezifische Proteoglykane (Abb. 3b), Kollagen Typ I (Abb. 3c), Kollagen Typ II (Abb. 3d) Kollagen Typ III (Abb. 3e) und S100 (Abb. 3f) aufweisen und ihre Eigenschaften durch  
20 das Prozedere des Einfrierens und Auftauens erhalten werden können.

Es ist erstaunlich, daß alle Zellen, die in den nach dieser Erfindung aus Bandscheibenzellen isoliert aus vorgefallenem, degenerierten Bandscheibengewebe und daraus hergestellten Bandscheibenzellaggregaten in selbige integriert sind, überleben und auch nach fortschreitender Kultivierungsdauer die Zellen im Inneren nicht absterben. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer differenzieren die  
30 Zellen im Inneren der Aggregate aus und es bilden sich Bandscheibenknorpelgewebe, die aus ECM, differenzierten Zellen und einer Proliferationszone am Rand bestehen. Während der Differenzierung in Zellkultur wird der Abstand der aggregierten Zellen durch Bildung der  
35 gewebespezifischen Matrix immer größer. Es entsteht im

5 Inneren der in vitro hergestellten Bandscheibengewebe eine  
Gewebehistologie, die dem natürlichen Gewebe sehr ähnlich  
ist. Die Versorgung der Zellen im Inneren der in vitro  
Bandscheibengewebe erfolgt allein durch die Diffusion der  
Nährstoffe. Während der weiteren Herstellung der  
10 Bandscheibenknorpelgewebe bildet sich die  
Proliferationszone am Rand selbiger aus. Diese Zone hat den  
unschätzbaren Vorteil, daß nach Einbringen der so  
entstandenen Bandscheibenknorpelgewebe in degenerierte  
Bandscheiben, die in dieser Randzone befindlichen Zellen in  
der Lage sind, auszuwandern und aktiv den Kontakt zum  
umliegenden Gewebe herzustellen bzw. eine Integration des  
in vitro gebildeten Bandscheibenknorpelgewebes in seine  
Umgebung ermöglichen. Damit sind die hergestellten  
gewebespezifischen Zellaggregate hervorragend zur Behand-  
20 lung von degenerierten Bandscheiben und zum Neuaufbau von  
Bandscheibengewebe *in vivo* geeignet.

Aufgrund der biomechanischen Belastung der Bandscheiben  
direkt nach Behandlung sowie dem Ziel die Bandscheibe in  
ihrer Höhe gleich mit der Transplantation des  
Bandscheibenknorpelgewebes wiederherzustellen, kann es von  
Vorteil sein, bereits größere, mechanisch stabile  
Gewebestücke zu transplantieren. Für diesen Fall werden  
mindestens zwei, besser aber mehr der erhaltenen in vitro  
30 Bandscheibenknorpelgewebe fusioniert, indem sie gemeinsam  
unter den gleichen Bedingungen und in den gleichen  
Kulturgefäßen wie oben beschrieben bis zur gewünschten  
Größe weiterkultiviert werden.

5 Abb. 4 zeigt fünf fusionierende Bandscheibengewebe. Es ist  
zu sehen, dass die beiden Gewebekugeln aneinander haften  
und sozusagen verschmelzen, die Grenze zwischen den beiden  
Bandscheibengeweben ist nicht mehr zu erkennen. Nach  
längerer Kultivierungszeit fusionieren die  
10 Bandscheibengewebe vollständig und es entsteht ein größeres  
in vitro Gewebestück. Der Aufbau der so erhaltenen größeren  
Zellaggregate ist mit dem der zunächst erhaltenen in vitro  
Bandscheibengewebe identisch. Sie können bis zu maximal 99%  
ECM beinhalten und alle im erhaltenen Gewebestück  
enthaltenen Zellen sind vital.

20 Das erhaltene Bandscheibenknorpelgewebe ist außerordentlich  
stabil. Die in vitro Bandscheibengewebe können auf  $\frac{1}{4}$  ihres  
Durchmessers komprimiert werden, ohne daß sie zerbrechen  
oder beispielsweise beim Injizieren in den Körper mittels  
einer Kanüle zerrissen werden. Es ist möglich, diese  
Gewebestückchen mit einer Pinzette oder einer Pipette zu  
handeln.

30 Als Zellkulturmedium kann sowohl für die Suspensions- als  
auch für die Monolayerkultur übliches Medium, z. B.  
Dulbecco's MEM, unter Zusatz von Serum, verwendet werden.  
Vorzugsweise wird DMEM und Hams im Verhältnis 1:1  
eingesetzt. Um jedoch immunologische Reaktionen des  
Patienten auf das in vitro hergestellte Gewebe zu  
vermeiden, wird als Serum vorzugsweise autogenes Serum des  
Patienten eingesetzt. Es ist auch möglich xenogenes oder  
allogenes Serum zu verwenden.

5 Dem Kulturmedium werden erfindungsgemäß keine Antibiotika,  
Fungistatika oder andere Hilfsstoffe zugesetzt. Es hat sich  
gezeigt, daß nur die autogene oder allogene Kultivierung  
der Zellen und Zellaggregate sowie die Kultivierung ohne  
Antibiotika und Fungistatika eine unbeeinflusste Morphologie  
10 sowie Differenzierung der Zellen in der Monolayerkultur und  
eine ungestörte Bildung der spezifischen Matrix in den  
Zellaggregaten ermöglicht. Weiterhin sind durch den  
Verzicht sämtlicher Zusatzstoffe während der Herstellung  
nach Einbringen des in vitro hergestellten Gewebes in den  
menschlichen und auch tierischen Organismus sämtliche  
immunologische Reaktionen ausgeschlossen.

Die Größe der hergestellten Bandscheibengewebe hängt  
natürlich von der eingebrachten Zellzahl pro Volumen  
Kulturmedium ab. Werden beispielsweise  $1 \times 10^7$  Zellen in  
300 µl Kulturmedium eingebracht, so entstehen innerhalb von  
1 Woche dreidimensionale Sphäroide von ca. 500-700 µm  
Durchmesser. Die andere Möglichkeit ist die in vitro-Fusion  
der kleinen Zellaggregate zu größeren - wie oben  
beschrieben - und das Einbringen dieser in die Bandscheibe.  
Vorzugsweise werden erfindungsgemäß zwischen  $1 \times 10^4$  und  
 $1 \times 10^7$  Zellen in 300 µl Kulturmedium zur Herstellung der  
kleinen Zellaggregate verwendet, besonders bevorzugt  
 $1 \times 10^5$  Zellen. Die nach einigen Tagen gebildeten in vitro  
30 Bandscheibengewebe werden dann für mindestens 2-4 Wochen in  
Abhängigkeit von der Zellart und den patientenspezifischen  
Charakteristika in dem geeigneten Kulturmedium kultiviert,  
um die Ausbildung der gewebespezifischen Matrix zu  
induzieren. Im besonderen Falle können dann einzelne in  
35 vitro Bandscheibengewebe ab ca. einer Woche Kultivierung

5 fusioniert werden, um die Größe des Gewebestückes zu erhöhen.

10 Als Zellkulturgefäße müssen für die erfindungsgemäße Kultivierung in Suspension solche mit hydrophober, also adhäsionsverhindernder Oberfläche, wie z. B. Polystyrol oder Teflon, eingesetzt werden. Zellkulturgefäße mit nichthydrophober Oberfläche können durch Beschichten mit Agar oder Agarose hydrophobiert werden. Weitere Zusätze sind nicht erforderlich. Vorzugsweise dienen als Zellkulturgefäße Napfplatten. Dabei können für die Herstellung der kleinen Zellaggregate beispielsweise 96-Napfplatten und für die Herstellung der fusionierten Aggregate 24-Napfplatten Verwendung finden.

20 Gegenstand der Erfindung sind auch therapeutische Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen Bandscheibenzelltransplantate und das Bandscheibenknorpelgewebe umfassen, z.B. Injektionslösungen.

30 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Bandscheibenknorpelgewebe zur Testung von Wirkstoffen, die z. B. die Bildung und Differenzierung von Matrix und Zellen beeinflussen. Dazu werden die Bandscheibenzellaggregate erfindungsgemäß hergestellt und in unterschiedlichen Reifestadien werden die zu testenden Medikamente hinzugegeben und unterschiedlichste Parameter der in vitro Bandscheibengewebeherstellung und -reifung charakterisiert. Diese Tests sind im Vergleich zu den  
35 herkömmlichen Medikamententests an Tieren oder

5 Tumorsystemen durch die Verwendung von nur autologem Material sehr patientenspezifisch und ermöglichen eine individuelle Diagnose.

10 Nachfolgend soll die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erklärt werden, ohne sie darauf einzuschränken.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1: Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten

Aus dem vorgefallenen, degenerierten Bandscheibengewebe werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen isoliert. Nach Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe, werden diese in Zellkulturflaschen überführt und unter 20 Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden die Bandscheibenzellen in physiologische Kochsalzlösung überführt und zur Transplantation zur Verfügung gestellt.

30 In einem in vitro Modell konnte das Differenzierungspotential der im Zelltransplantat enthaltenen Bandscheibenzellen aufgezeigt werden. Es werden Bandscheibenspezifische Matrixproteine und Markerproteine exprimiert (Abb. 3) und damit eine Bandscheiben-spezifische Gewebestruktur aufgebaut.



### Beispiel 2: Transplantation von Bandscheibenknorpelzellen

Die in Beispiel 1 hergestellten Bandscheibenzelltransplantate (mind. 1.000, max. 100 Millionen Zellen) vorzugsweise ca. 1 Million Bandscheibenknorpelzellen wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in den Zwischenwirbelraum einer degenerierten Bandscheibe eingespritzt. Es wurde unter anderem festgestellt, dass in der behandelten Bandscheibe der Wassergehalt wieder ansteigt, sowie die Höhe des Zwischenwirbelraumes aufrechterhalten werden kann, was beides auf die durch die Bandscheibenknorpelzellen synthetisierten Matrixproteine zurückzuführen ist.

Die erfindungsgemäße in vitro hergestellte Bandscheibenzelltransplantate werden von den Patienten angenommen, gewährleisten eine rasche Integration der proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen sowie eine Regeneration des Bandscheibengewebes durch die Differenzierungsfähigkeit der enthaltenen Zellen. Somit erlauben Eigenschaften der Bandscheibenzelltransplantate den schnellen Wiederaufbau von Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung der Patienten und die Wiederherstellung der Bandscheibenfunktion.

### Beispiel 3: in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpelgewebe

Aus dem vorgefallene Bandscheibengewebe werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen isoliert. Nach Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe, werden diese in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

5 inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden  $1 \times 10^5$  Zellen in je  
10 ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet ist. Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten angeordnet. Diese Aggregate werden alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert. Die Zellen können hier auch passagiert werden.

In diesen *in vitro* Bandscheibengeweben wurde die Expression und Deposition von bandscheiben-spezifischen Matrixbestandteilen und Markerproteinen wie Aggrecan (Abb. 3a), hyalin-spezifische Proteoglykane (Abb. 3b), Kollagen Typ I (Abb. 3c), Kollagen Typ II (Abb. 3d), Kollagen Typ  
20 III (Abb. 3e) und S100 (Abb. 3f) nachgewiesen. Diese Bestandteile des nativen Bandscheibenknorpelgewebes *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für die Funktion des Knorpels von entscheidender Bedeutung sind.

#### Beispiel 4: Transplantation von Bandscheibenknorpelgewebe

Das in Beispiel 3 hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe (ca. 10 bis 1000 Gewebestückchen aus je  $1 \times 10^5$  Zellen)  
30 vorzugsweise 100 Gewebestückchen wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in den Zwischenwirbelraum von stark degenerierten oder auch stark traumatisch geschädigten Bandscheiben mit zerstörtem Annulus Fibrosus eingespritzt. Es wurde unter anderem festgestellt, dass die  
35 erfindungsgemäß *in vitro* hergestellte

5 Bandscheibenknorpelgewebe von den Patienten angenommen  
werden und gewährleistet neben der Erfüllung der  
mechanischen Funktion des hergestellten Gewebes die rasche  
Integration der hergestellten Gewebestücke durch die  
10 proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen in der  
äußeren Schicht der Aggregate sowie eine Regeneration des  
Bandscheibengewebes durch die Differenzierungsfähigkeit der  
enthaltenen Zellen. Somit erlaubt die Struktur und Funktion  
der Gewebestücke den schnellen Wiederaufbau von  
Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung der Patienten  
und die Wiederherstellung der Bandscheibenfunktion.

5

**Patentansprüche**

- 10 1. Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten, dadurch gekennzeichnet, daß aus vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe Bandscheibenknorpelzellen isoliert und unter Erhalt ihrer Eigenschaften vermehrt werden können sowie differenzierungsfähig sind und damit in der Lage sind Bandscheibengewebe nach Transplantation und in vitro aufzubauen.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bandscheibenknorpelzellen aus vorgefallenem und degeneriertem Bandscheibengewebe isoliert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Bandscheibenknorpelzellen unter streng autologen Kulturbedingungen, d.h. nur unter Zusatz von patienten-eigenem Serum im Zellkulturmedium vermehrt werden
- 30 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Bandscheibenknorpelzellen derart vermehrt werden, daß ihre Eigenschaften im Hinblick auf die Synthese von spezifischen Matrixproteinen und Markerproteinen nicht verändert wird.

- 5 5. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die isolierten Bandscheibenknorpelzellen nach kurzer  
Vorkultivierung eingefroren werden und wieder aufgetaut  
werden können, ohne dass ihre Eigenschaften im Hinblick  
10 auf die Synthese von spezifischen Matrixproteinen und  
Markerproteinen verändert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung  
in Monolayer, die Eigenschaft zum Aufbau einer  
Matrixstruktur bestehend aus spezifischen  
Bandscheibenmatrixproteinen aufweisen.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung  
in Monolayer und dem Einfrieren und folgendem Auftauen,  
die Eigenschaft zum Aufbau einer Matrixstruktur  
bestehend aus spezifischen Bandscheibenmatrixproteinen  
aufweisen.
- 30 8. Verwendung von Bandscheibenzelltransplantaten gemäß  
Anspruch 1 als autogenes, xenogenes oder allogenes  
Transplantationsmaterial zur Behandlung von  
degenerierten Bandscheiben

- 5 9. Therapeutische Zubereitung umfassend  
Bandscheibenzelltransplantate gemäß Anspruch 1.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß die  
Bandscheibenknorpelzellen und in vitro  
Bandscheibenknorpelgewebe auch in Anwesenheit von  
wachstumsfördernden Zusätzen kultiviert werden können.

5

### Zusammenfassung

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten hergestellt aus Bandscheibenzellen isoliert aus vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe, die unter Erhalt ihrer spezifischen Eigenschaften vermehrt werden, eine hohe Proliferationskapazität aufweisen, differenzierungsfähig im Hinblick auf die Ausbildung einer Bandscheiben-spezifischen Matrix sind und transplantiert werden.

20

Gegenstand der Erfindung sind auch das hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe beinhalten.

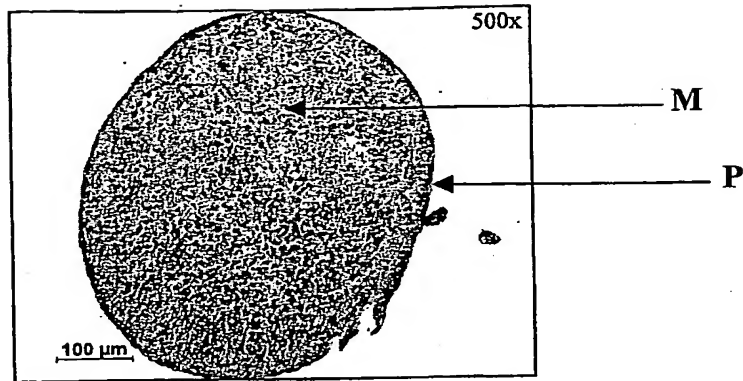


Abb.1



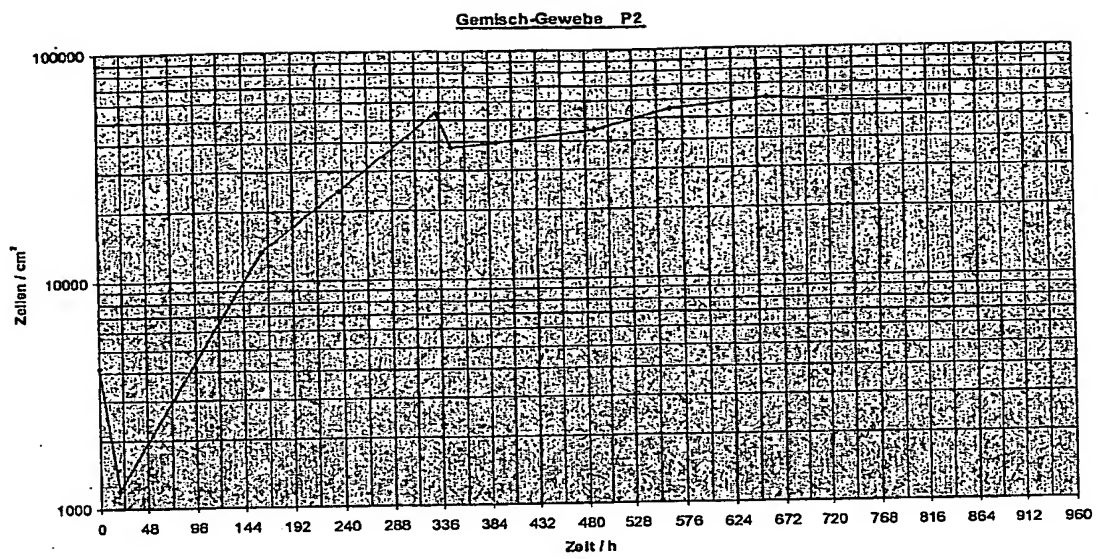


Abb.2

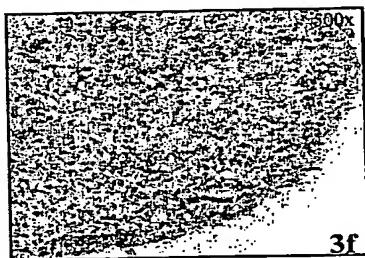
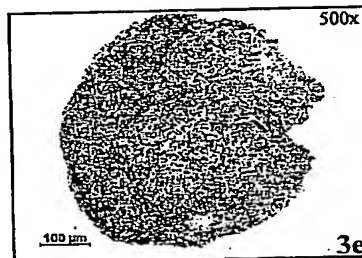
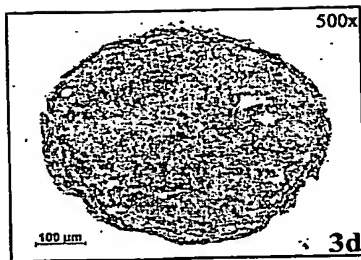
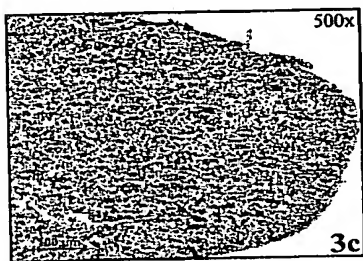
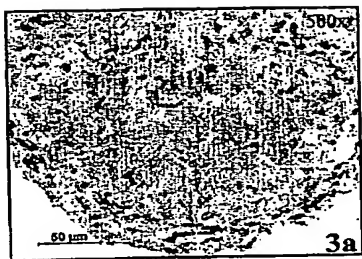


Abb.3

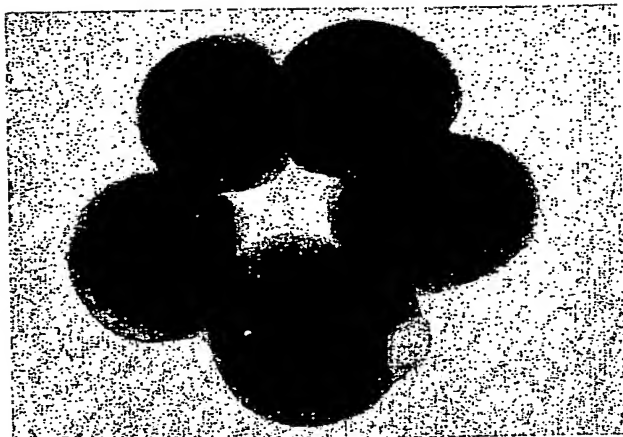


Abb.4